# WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM Internationales Büro

INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation 6:

C07H 1/08, B03C 1/01, C03C 17/30, C12Q 1/68

(11) Internationale Veröffentlichungsnummer:

WO 99/16781

A3

(43) Internationales Veröffentlichungsdatum:

8. April 1999 (08.04.99)

(21) Internationales Aktenzeichen:

PCT/EP98/06196

(22) Internationales Anmeldedatum:

29. September 1998 (29.09.98) (81) Bestimmungsstaaten: AU, CA, CZ, HU, IL, JP, KR, MX, PL, SK, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK,

ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).

(30) Prioritätsdaten:

197 43 518.1

1. Oktober 1997 (01.10.97)

DE

Veröffentlicht

Mit internationalem Recherchenbericht.

Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist. Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen

eintreffen.

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): ROCHE DIAGNOSTICS GMBH [DE/DE]; Sandhofer Strasse 116.

D-68305 Mannheim (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): KLEIBER, Jörg [DE/DE]; Fichtenstrasse 18, D-82377 Penzberg (DE). MARK-ERT-HAHN, Christine [DE/DE]; Saelweiherstrasse 54, D-82377 Penzberg (DE). HARTTIG, Herbert [DE/DE]; Feuerbachstrasse 11, D-67122 Altrip (DE).

(74) Anwälte: WEICKMANN, H. usw.; Kopernikusstrasse 9, D-81679 München (DE).

(88) Veröffentlichungsdatum des internationalen Recherchenberichts: 16. September 1999 (16.09.99)

(54) Title: AUTOMATABLE METHOD FOR PREPARING SAMPLES WHICH CAN BE UNIVERSALLY APPLIED

(54) Bezeichnung: AUTOMATISIERBARE UNIVERSELL ANWENDBARE PROBENVORBEREITUNGSMETHODE

(57) Abstract

The invention relates to a method for preparing biological samples for a subsequent detection of an analyte, especially of a nucleic acid, in said sample. The invention also relates to the preparation of reagent kits, novel devices for preparing samples and novel magnetic pigments.

(57) Zusammenfassung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Vorbereitung biologischer Proben für den anschließenden Nachweis eines Analyten, insbesondere einer Nukleinsäure, in dieser Probe. Weiterhin werden Reagenzienkits und neue Vorrichtungen zur Probenvorbereitung sowie neue magnetische Pigmente bereitgestellt.

#### LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidschan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Мопасо	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland		Republik Mazedonien	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	ML	Mali	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	ΙE	Irland	MN	Mongolei	UA.	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MR	Mauretanien	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MW	Malawi	US	Vereinigte Staaten von
CA	Kanada	IT	Italien	MX	Mexiko		Amerika
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CG	Kongo	KE	Келіа	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik	NZ	Neuseeland	zw	Zimbabwe
CM	Kamerun		Korea	PL	Polen		
CN	China	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CU	Kuba	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CZ	Tschechische Republik	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
DE	Deutschland	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DK	Dänemark	ĻK	Sri Lanka	SE	Schweden		
EE	Estland ·	LR	Liberia	SG	Singapur		
					- •		

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

In .ational Application No PCT/EP 98/06196

A. CLASSI IPC 6	FICATION OF SUBJECT MATTER C07H1/08 B03C1/01 C03C17/3	30 C12Q1/68							
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC									
B. FIELDS	SEARCHED								
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 6 C07H B03C C03C C12Q									
Dogumente	the second of the three majority and the second of the sec								
Documenta	tion searched other than minimum documentation to the extent that s	uch documents are included in the fields se	arched						
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)									
C. DOCUM	ENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT								
Category '	Citation of document, with indication, where appropriate, of the rel	evant passages	. Relevant to claim No.						
Х	WO 96 41811 A (BOEHRINGER MANNHE); KLEIBER JOERG (DE); WALTER THOMA 27 December 1996 (1996-12-27) cited in the application		1-18, 21-27						
	see the whole document, in parti and 4	cular examples 3							
Х	EP 0 757 106 A (TOYO BOSEKI) 5 February 1997 (1997-02-05) cited in the application		1,4-6, 24-27						
	see the whole document, in parti	cular example 1							
X	WO 88 06633 A (ARNOLD LYLE JOHN 3 NORMAN CHARLES (US); REYNOLDS MAR 7 September 1988 (1988-09-07) claims 1-19		1,4-6, 24-27						
	<u>.</u>	-/							
	ner documents are listed in the continuation of box C.	X Patent tamily members are listed in	n annex.						
* Special categories of cited documents :  "T" later document published after the international filling date									
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the									
"E" earlier document but published on or after the international "X" document of particular relevance; the claimed invention									
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or involve an inventive step when the document is taken alone which is cited to establish the publication date of another									
citation or other special reason (as specified)  "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or document is combined with one or more other such docu-									
other means ments, such combination being obvious to a person skilled in the art.  "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "&" document member of the same patent family									
Date of the actual completion of the international search  Date of mailing of the international search report									
21 July 1999 28/07/1999									
Name and n	nailing address of the ISA	Authorized officer							
	European Patent Office, P.B. 5818 Patentiaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk		•						
	Tel. (+31-70) 340-2040. Tx. 31 651 epo ni, Fax: (+31-70) 340-3016	Scott, J.							

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

PCT/EP 98/06196

C.(Continue	tion) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT	FC1/EF 98/00196			
	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages		Relevant to claim No.		
X	BOOM R ET AL: "RAPID AND SIMPLE METHOD FOR PURIFICATION OF NUCLEIC ACIDS" JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY, vol. 28, no. 3, March 1990 (1990-03), pages 495-503, XP002911989 ISSN: 0095-1137 cited in the application the whole document		Relevant to claim No.		
			·		
		·			
	·				
	Ð				
	·				

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

Ir. ational Application No
PCT/EP 98/06196

Patent document cited in search report		Publication date	ş	Patent family member(s)	Publication date	
WO	9641811	A	27-12-1996	DE	19520398 A	12-12-1996
				DE	19537985 A	17-04-1997
				AU	6300796 A	09-01-1997
				CA	2223821 A	27-12-1996
				CN	1192217 A	02-09-1998
	•			EP	0837871 A	29-04-1998
				NO	975772 A	06-02-1998
EP	0757106	A	05-02-1997	JP	9019292 A	21-01-1997
WO	8806633	Α .	07-09-1988	AT	107654 T	15-07-1994
				AU	1426988 A	26-09-1988
				DE	3850273 D	28-07-1994
				DE	38 <b>50273</b> T	29-09-1994
			,	DK	607588 A	28-12-1988
				EP	0281390 A	07-09-1988
				ES	2054797 T	16-08-1994
				FI	885022 A	01-11-1988
				JP	1502319 T	17-08-1989
				JP	2862547 B	03-03-1999
				KR	9600479 B	08-01-1996
			•	PT	86881 A	30-03-1989
				US	5599667 A	04-02-1997

#### INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

In. ationales Aktenzeichen
PCT/FP 98/06196

PCT/EP 98/06196. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES PK 6 C07H1/08 B03C1/01 C1201/68 C03C17/30 Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK **B. RECHERCHIERTE GEBIETE** Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole) IPK 6 CO7H BO3C CO3C C12Q Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe) C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile Betr. Ansoruch Nr. X WO 96 41811 A (BOEHRINGER MANNHEIM GMBH 1-18.;KLEIBER JOERG (DE); WALTER THOMAS (DE);) 21-27 27. Dezember 1996 (1996-12-27) in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument, insbesondere Beispiele 3 und 4 χ EP 0 757 106 A (TOYO BOSEKI) 1.4-6.5. Februar 1997 (1997-02-05) 24 - 27in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument, insbesondere Beispiel X WO 88 06633 A (ARNOLD LYLE JOHN JR ; NELSON 1,4-6NORMAN CHARLES (US); REYNOLDS MARK ALA) 24-27 7. September 1988 (1988-09-07) Ansprüche 1-19 X Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu Siehe Anhang Patentfamilie entnehmen Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist Anmeldung nicht kollkliert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist "E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist "X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden "L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft er-scheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätligkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie son oder die aus einem auseren beschatte.

O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht "P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist "&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist Datum des Abschlusses der internationalen Recherche Absendedatum des internationalen Recherchenberichts 21. Juli 1999 28/07/1999 Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde Bevollmächtigter Bediensteter Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentiaan 2

1

NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl. Fax: (+31-70) 340-3016

Scott, J

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

In. ationales Aktenzeichen
PCT/EP 98/06196

Kategorie°	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.	
X	BOOM R ET AL: "RAPID AND SIMPLE METHOD FOR PURIFICATION OF NUCLEIC ACIDS" JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY, Bd. 28, Nr. 3, März 1990 (1990-03), Seiten 495-503, XP002911989 ISSN: 0095-1137 in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument	1,4-6	
	·		
		·	
		·	
		·	
		*	
	•		

### INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

In. utionales Aktenzeichen PCT/EP 98/06196

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument		Datum der Veröffentlichung		itglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung	
WO 9641811	Α	27-12-1996	DE	19520398 A	12-12-1996	
·			DE	19537985 A	17-04-1997	
			AU	6300796 A	09-01-1997	
			CA	2223821 A	27-12-1996	
			CN	1192217 A	02-09-1998	
			EP.	0837871 A	2 <b>9-</b> 04-1998	
			NO	975772 A	06-02-1998	
EP 0757106	Α	05-02-1997	JP	9019292 A	21-01-1997	
WO 8806633	Α	07-09-1988	AT	107654 T	15-07-1994	
			AU	1426988 A	26-09-1988	
			DE	3850273 D	28-07-1994	
			DE	3850273 T	29-09-1994	
			DK	607588 A	28-12-1988	
			EP	0281390 A	07-09-1988	
			ES	2054797 T	16-08-1994	
			FI	885022 A	01-11-1988	
			JP	1502319 T	17-08-1989	
			JP	2862547 B	03-03-1999	
			. KR	9600479 B	08-01-1996	
			PT	86881 A	30-03-1989	
			US	5599667 A	04-02-1997	

## WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM

Internationales Büro

INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation 6: (11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 99/16781 C07H 21/00 **A2** (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 8. April 1999 (08.04.99)

(21) Internationales Aktenzeichen:

PCT/EP98/06196

(22) Internationales Anmeldedatum:

29. September 1998

(29.09.98)

(30) Prioritätsdaten:

197 43 518.1

1. Oktober 1997 (01.10.97)

DE

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): ROCHE DIAGNOSTICS GMBH [DE/DE]; Sandhofer Strasse 116, D-68305 Mannheim (DE).

(72) Erfinder; und

- (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): KLEIBER, Jörg [DE/DE]; Fichtenstrasse 18, D-82377 Penzberg (DE). MARK-ERT-HAHN, Christine [DE/DE]; Saelweiherstrasse 54, D-82377 Penzberg (DE). HARTTIG, Herbert [DE/DE]; Feuerbachstrasse 11, D-67122 Altrip (DE).
- (74) Anwälte: WEICKMANN, H. usw.; Kopernikusstrasse 9, D-81679 München (DE).

(81) Bestimmungsstaaten: AU, CA, CZ, HU, IL, JP, KR, MX, PL, SK, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).

#### Veröffentlicht

Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.

- (54) Title: AUTOMATABLE METHOD FOR PREPARING SAMPLES WHICH CAN BE UNIVERSALLY APPLIED
- (54) Bezeichnung: AUTOMATISIERBARE UNIVERSELL ANWENDBARE PROBENVORBEREITUNGSMETHODE

#### (57) Abstract

The invention relates to a method for preparing biological samples for a subsequent detection of an analyte, especially of a nucleic acid, in said sample. The invention also relates to the preparation of reagent kits, novel devices for preparing samples and novel magnetic pigments.

#### (57) Zusammenfassung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Vorbereitung biologischer Proben für den anschließenden Nachweis eines Analyten, insbesondere einer Nukleinsäure, in dieser Probe. Weiterhin werden Reagenzienkits und neue Vorrichtungen zur Probenvorbereitung sowie neue magnetische Pigmente bereitgestellt.

### LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidschan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland		Republik Mazedonien	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungam	ML	Mali	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MN	Mongolei	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MR	Mauretanien	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MW	Malawi	US	Vereinigte Staaten von
CA	Калада	IT	Italien	MX	Mexiko		Amerika
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CG	Kongo	KE	Kenia	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik	NZ	Neuseeland	zw	Zimbabwe
CM	Kamerun		Korea	PL	Polen		
CN	China	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CU	Kuba	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CZ	Tschechische Republik	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
DE	Deutschland	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DK	Dänemark	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
EE	Estland	LR	Liberia	SG	Singapur		

#### Automatisierbare universell anwendbare Probenvorbereitungsmethode

#### Beschreibung

5

10

15

20

25

30

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Vorbereitung biologischer Proben für den anschließenden Nachweis eines Analyten, insbesondere einer Nukleinsäure, in dieser Probe. Weiterhin werden Reagenzienkits und neue Vorrichtungen zur Probenvorbereitung sowie neue magnetische Pigmente bereitgestellt.

Bei einem Verfahren zum Nachweis eines Analyten in einer biologischen Probe werden an die Probenvorbereitung oft besondere Anforderungen gestellt. Zum einen ist der Analyt oft in sehr geringer Konzentration vorhanden und zum anderen finden sich oft viele andere Substanzen in der Probe, die die Isolierung bzw. Bestimmung des Analyten beeinträchtigen können.

WO 96/41811 offenbart ein Verfahren zur Isolierung eines Analyten, insbesondere einer Nukleinsäure, aus einer biologischen Probe, wobei die Probe, die den Analyten in einer Flüssigkeit enthält, mit magnetischen Partikeln, die eine äußere Glasoberfläche, die im wesentlichen porenfrei ist oder Poren eines Durchmessers von < 10 nm aufweist, in Kontakt gebracht wird, unter Bedingungen, bei denen der Analyt an die Partikeloberfläche bindet, und der gebundene Analyt von der Probenflüssigkeit abgetrennt wird. Das in WO 96/46811 beschriebene Verfahren eignet sich sehr gut zur Aufreinigung eines Analyten aus einer biologischen Probe. Es ist jedoch nicht ohne weiteres für eine automatisierte Probenvorbereitung einsetzbar.

Boom et al. (J. Clin. Microbiol. 28 (1990), 495-503) beschreiben ebenfalls ein Protokoll für Aufreinigung von Nukleinsäuren aus einer biologischen Probe unter Verwendung größenfraktionierter Siliciumoxidteilchen. Dieses

10

15

25

Verfahren ist jedoch umständlich, nicht für eine Automatisierung geeignet und enthält darüber hinaus die Gefahr von Verschleppungen.

Bei einer in EP-A-O 757 106 beschriebenen Methode zur Extraktion von Nukleinsäuren wird eine Probe lysiert, die in der Probe vorhandenen Nukleinsäuren an superparamagnetische Metallteilchen gebunden, diese mit einer Pipette aus dem Probengefäß entfernt und somit von den übrigen Probenbestandteilen abgetrennt. Dieses Verfahren hat den Nachteil, daß aufgrund der Notwendigkeit, den Analyten mit einer Pipette aus der Probe zu entfernen, Verluste auftreten können. Darüber hinaus beinhaltet die Verwendung mehrerer Reaktionsgefäße die Gefahr von Verschleppungen und Kontaminationen.

Die der vorliegenden Erfindung zugrundeliegende Aufgabe bestand somit darin, ein neues Probenvorbereitungsverfahren bereitzustellen, bei dem die Nachteile des Standes der Technik mindestens teilweise beseitigt sind. Insbesondere soll das neue Verfahren automatisierbar sein und ein möglichst einfaches Temperaturprofil aufweisen.

- Diese Aufgabe wird gelöst durch Verfahren zur Isolierung eines Analyten aus einer biologischen Probe, umfassend die Schritte:
  - (a) Aufschließen der Probe in einem Reaktionsgefäß,
  - (b) Zugeben einer festen Adsorptionsmatrix,
  - (c) Inkubieren unter Bedingungen, bei denen der Analyt an die Adsorptionsmatrix bindet,
  - (d) Entfernen nichtgebundener Probenbestandteile aus dem Reaktionsgefäß,
  - (e) Inkubieren unter Bedingungen, bei denen der Analyt von der Adsorptionsmatrix eluiert wird, und
- 30 (f) Abtrennen des Eluats von der Adsorptionsmatrix.

20

25

30

ähnliches.

Ein weiterer Aspekt der vorliegenden Erfindung ist ein Verfahren zur Isolierung eines Analyten aus einer biologischen Probe, umfassend die Schritte:

- (a) Aufschließen der Probe in einem Reaktionsgefäß,
- (b) Zugeben einer festen Adsorptionsmatrix,
  - (c) Inkubieren unter Bedingungen, bei denen der Analyt an die Adsorptionsmatrix bindet,
  - (d) Abtrennen nichtgebundener Probenbestandteile von der Adsorptionsmatrix,
- 10 (e) Inkubieren unter Bedingungen, bei denen der Analyt von der Adsorptionsmatrix eluiert wird, und
  - (f) Abtrennen des Eluats von der Adsorptionsmatrix, wobei zumindest die Schritte (c) und (d) bei im wesentlichen der gleichen Temperatur durchgeführt werden.

Das erfindungsgemäße Verfahren beruht auf der selektiven Bindung von Analyten an eine feste Adsorptionsmatrix in Gegenwart eines Probenaufschlußpuffers, wobei der Analyt, bei dem es sich vorzugsweise um eine Nukleinsäure wie DNA, z.B. chromosomale DNA, fragmentierte chromosomale DNA, Plasmid-DNA, virale DNA etc., oder RNA, z.B. mRNA, tRNA, rRNA oder virale RNA etc. handelt, von Verunreinigungen der Probe wie etwa Proteinen oder Zelltrümmern abgetrennt wird. Die Probe kann eine beliebige biologische Probe sein, z.B. eine Körperflüssigkeit wie Blut, Plasma, Urin etc, eine Gewebeprobe, eine Probe von kultivierten Zellen oder

Die beim erfindungsgemäßen Verfahren verwendete Adsorptionsmatrix ist in der Lage, eine unter den Reaktionsbedingungen weitgehend selektive Bindung des Analyten zu gewährleisten. Vorzugsweise verwendet man eine partikuläre Adsorptionsmatrix, die vorzugsweise eine Glasoberfläche enthält. Besonders bevorzugt sind magnetische Glaspartikel, insbesondere die in WO 96/41811 beschriebenen magnetischen Partikel mit einer äußeren

WO 99/16781 PCT/EP98/06196

- 4 -

Glasoberfläche, die im wesentlichen porenfrei ist oder Poren eines Durchmessers von weniger als 10 nm aufweist. Besonders bevorzugt sind ferromagnetische Partikel, die eine Korngröße zwischen 10 und 60  $\mu$ m aufweisen. Solche Partikel können beispielsweise einen Kern aus Glimmer und darauf immobilisierten Magnetpartikeln enthalten, der von der Glasschicht umschlossen ist. Während in WO 96/41811 die magnetischen Partikel in fester Form, z.B. als Tabletten oder Pulver, in den jeweils verwendeten Reaktionsgefäßen vorgelegt werden, setzt man die magnetischen Partikeln erfindungsgemäß vorzugsweise in Form einer Suspension ein. B. sonders geeignet haben sich alkoholische Suspensionen mit einer Konzentration von etwa 5 bis 20 mg/ml erwiesen. Überraschenderweise wurde festgestellt, daß trotz der hohen spezifischen Dichte der magnetischen Glaspartikel die Suspension mit hoher Reproduzierbarkeit aus einem Vorratsbehälter abgezogen werden kann, wodurch eine Automatisierbarkeit der Verfahrensführung ermöglicht wird.

5

10

15

20

25

30

Obwohl beim erfindungsgemäßen Verfahren die in WO 96/41811 beschriebenen Glaspartikel gute Resultate zeigen, werden besonders gute Ergebnisse mit Glaspartikeln erhalten, deren Glasphase folgende Metalloxide umfasst. SiO<sub>2</sub>, B<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, Alkalimetalloxid, z.B. K<sub>2</sub>O oder/und Na<sub>2</sub>O sowie gegebenenfalls Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> und ein Erdalkalimetalloxid z.B. CaO. Die Anteile dieser Metalloxide sind vorzugsweise wie folgt: 50 bis 95 mol-% SiO<sub>2</sub>, 0,2 bis 30 mol-% B<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, 0 bis 10 mol-% Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, 0 bis 20 mol-% Erdalkalimetalloxid und 0,2 bis 20 mol-% Alkalimetalloxid, wobei die Prozentangaben jeweils auf das Gesamtgewicht der Glasphase bezogen sind.

Für die Isolierung von RNA hat sich beispielsweise eine Glasphase, die  $SiO_2$ ,  $B_2O_3$ ,  $K_2O$ ,  $AI_2O_3$  und CaO enthält, als besonders geeignet erwiesen. Für die Isolierung von DNA hat sich eine Glasphase, die  $SiO_2$ ,  $B_2O_3$  und  $Na_2O$  enthält, als besonders geeignet erwiesen.

Die Adsorptionsmatrix wird beim erfindungsgemäßen Verfahren vorzugsweise in einer Menge zugegeben, welche der minimalen, zur quantitativen Bindung des in der Probe vorhandenen Analyten, insbesondere einer Nukleinsäure, benötigten Menge entspricht oder etwas größer, vorzugsweise um höchstens 50% und besonders bevorzugt um höchstens 20% über dieser Menge liegt. Die zu erwartende Nukleinsäuremenge in verschiedenen Arten von Proben kann - sofern sie nicht bereits bekannt ist - vorab durch übliche Techniken, z.B. Phenol/ Chloroform-Extraktion und anschließende Messung der optischen Dichte ermittelt werden.

10

15

20

25

30

5

Schritt (a) des erfindungsgemäßen Verfahrens umfaßt das Aufschließen der Probe in einem Reaktionsgefäß. Dieser Aufschluß erfolgt im Allgemeinen durch Lyse der in der Probe vorhandene Zellen unter denaturierenden Bedingungn ,z.B. durch Zugabe einer Protease und eines Denaturierungspuffers. Als Proteinase wird vorzugsweise Proteinase K, Pronase, Elastase oder/und Lysozym verwendet. Besonders bevorzugt ist die Verwendung von Proteinase K.

Der Proteaseverdau erfolgt in einem Denaturierungspuffer, der eine chaotrope Verbindung, z.B. Harnstoff oder Harnstoffderivate, vorzugsweise ein chaotropes Salz, besonders bevorzugt ein Guanidiniumsalz wie etwa Guanidiniumhydrochlorid (insbesondere zur Isolierung von DNA) oder Guanidiniumthiocyanat (insbesondere zur Isolierung von RNA) oder ein Perchlorat oder lodid enthält. Für Guanidiniumsalze sind Konzentrationen im Bereich von 1 bis 3 mol/l bevorzugt.

Im Gegensatz zu der in WO 96/41811 beschriebenen Methode zur Probenvorbereitung erfolgt die Zugabe der festen Adsorptionsmatrix erst nach Aufschluß der Probe. Durch diese Verfahrensführung erreicht man eine signifikant geringere unspezifische Bindung von unerwünschten Probenbestandteilen, z.B. Proteinen, an der Adsorptionsmatrix.

WO 99/16781

Gemäß Schritt (c) erfolgt die selektive Bindung des Analyten an die Adsorptionsmatrix durch Inkubation im Aufschlußpuffer vorzugsweise unter chaotropen Bedingungen.

Schritt (d) des erfindungsgemäßen Verfahrens umfaßt das Abtrennen nicht gebundener Probenbestandteile von der Adsorptionsmatrix. Vorzugsweise werden hierzu die nichtgebundenen Probenbestandteile aus dem Reaktiosgefäß entfernt. Dies kann durch gegebenenfalls mehrmaliges Zugeben und Entfernen eines Waschpuffers erfolgen, der vorzugsweise einen Gehalt von mindestens 50% (v/v) und besonders bevorzugt von mindestens 60% (v/v) eines mit Wasser mischbaren organischen Lösungsmittels wie etwa Ethanol, Propanol und Aceton enthält.

Die Schritte (c), (d) oder/und (e) des erfindungsgemäßen Verfahren erfolgen vorzugsweise unter kontinuierlichem oder intervallartigem Mischen (d.h. Phasen, während denen gemischt wird, wechseln sich mit Phasen ab, in denen sich das Reaktionsgefäß im Ruhen befindet) ohne Zusatz externer Mittel. Vorzugsweise erfolgt dieses Mischen durch Drehung des Reaktionsgefäßes um seine Längsachse mit mehrmaliger Umkehr der Drehrichtung. Besonders bevorzugt wird das Mischungsgefäß exakt um seine Längsachse gedreht und der Drehrichtungswechsel so durchgeführt, daß die Meniskusauslenkung der Flüssigkeit unter einer vorbestimmten Trennziffer bleibt. Solche Mischverfahren sind in WO91/15768 und EP-A-0 435 481 beschrieben.

25

30

15

20

Die Dauer für die Schritte (c) oder/und (e) beträgt vorzugsweise maximal 20 min und umfaßt ein kontinuierliches Mischen oder ein Intervallmischen in kurzen Zyklen, vorzugsweise in kurzen Zyklen von vorzugsweise maximal 2 Minuten. Besonders gute Ergebnisse wurden durch Intervallmischen in einem einminütigen Zyklus umfassend 20 sec Mischen und 40 sec Ruhen erhalten.

WO 99/16781

5

10

15

20

25

30

Bei Verwendung von magnetischen Partikeln als Adsorptionsmatrix kann die Zugabe von Flüssigkeiten in das Reaktionsgefäß bzw. das Absaugen von Flüssigkeiten daraus unter kontinuierlichem Mischen erfolgen, wobei die Partikel während des Absaugevorgangs durch Einschalten des Magneten im Reaktionsgefäß gehalten werden. Durch diese Mischtechnik kann das erfindungsgemäße Verfahren flexibel auf verschiedene Probenarten eigestellt werden. Darüber hinaus wird ständig für eine gleichmäßige Verteilung der magnetischen Partikel in der Flüssigphase gesorgt.

Schritt (e) des erfindungsgemäßen Verfahrens umfasst die Elution des Analyten von der Adsorptionsmatrix. Hierzu kann einerseits - wie aus dem Stand der Technik bekannt - ein von organischen Lösungsmitteln im wesentlichen freier Niedrigsalzpuffer verwendet werden. Überraschenderweise wurde jedoch festgestellt, daß der Elutionspuffer zusätzliche Reagenzien enthalten kann, wie etwa Enzyme, z.B. zur Manipulation von Nukleinsäuren verwendete Enzyme wie etwa RNasen, DNasen, Restriktionsendonukleasen, Ligasen, terminale Transferasen oder/und Polymerasen. Wenn der Analyt beispielsweise eine DNA ist, kann während der Elution eine DNase-freie RNase zugesetzt werden, um den Gehalt an unerwünschter RNA zu verringern. Andererseits kann - wenn der Analyt eine RNA ist während der Elution eine RNase-freie DNase zugesetzt werden. Auf entsprechende Weise können auch andere Enzyme, wie etwa Restriktionsendonukleasen, etc. zugesetzt werden. Wenn die durch das erfindungsgemäße Verfahren isolierte Nukleinsäure nachfolgend einer Amplifikation unterzogen wird, kann während der Elution auch ein Nukleinsäureamplifikations-Mastermix, welcher den Amplifikationspuffer, Nukleotide, Primer, Polymerase und Puffersalze enthält, zugesetzt werden.

Schritt (f) des erfindungsgemäßen Verfahrens umfaßt das Abtrennen des Eluats von der Adsorptionsmatrix. Dieses Abtrennen kann auf übliche Weise erfolgen, z.B. durch Sedimentation, vorzugsweise aber durch magnetische Separation.

10

15

20

25

30

Die durch das erfindungsgemäße Verfahren isolierten Analyten können anschließend auf bekannte Weise weiterverarbeitet werden, im Fall von Nukleinsäuren, z.B. durch Amplifikation und nachfolgende Detektion, Detektion ohne vorhergehende Amplifikation oder Sequenzierung. Hierzu können Aliquots des Eluats selbst Bestimmungen unterschiedlicher Analyten zugeführt werden, z.B. verschiedene Viren, wie HIV, HCV und HBV.

Ein wichtiges Merkmal des erfindungsgemäßen Verfahrens ist, daß viele oder gegebenenfalls sogar alle Schritte bei im wesentlichen der gleichen Temperatur, d.h. innerhalb eines Temperaturbereichs von ± 2,5°C durchgeführt werden können. Vorzugsweise ist diese Temperatur im Bereich von Raumtemperatur bis 70°C, besonders vorzugt von Raumtemperatur bis 40°C, am meisten bevorzugt bei Raumtemperatur, d.h. ca. 18 bis 32°C. In einer bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens werden zumindest die Schritte (c) der Adsorption und (d) des Waschens bei dieser Temperatur durchgeführt. Besonders bevorzugt werden auch andere Schritte, insbesondere die Schritte (a) des Aufschließens oder/und (e) der Elution bei dieser Temperatur durchgeführt. Für die Bestimmung von HIV in Blutproben kann beispielsweise die gesamte Probenvorbereitung bei einer einheitlichen Temperatur erfolgen. Gegebenenfalls kann nach Schritt (f) des erfindungsgemäßen Verfahrens zusätzlich ein Nachbehandlungsschritt bei erhöhter Temperatur erfolgen, wodurch bei bestimmten Analyten die Ausbeuten bei einer Amplifikation verbessert wird. Bei anderen Analyten kann es erforderlich sein, daß die Vorbehandlung oder/und die Elution bei einer erhöhte Temperatur erfolgen. Die erhöhte Temperatur liegt dabei vorzugsweise im Bereich von mehr als 40°C bis 95°C, z.b. ca. 70 °C.

Die Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens erfolgt vorzugsweise in einer automatisierten Vorrichtung. Beispiele für solche Vorrichtungen sind nachfolgend beschrieben. Weiterhin ist bevorzugt, daß das erfindungs-

gemäße Verfahren zur Probenvorbereitung, zumindest die Schritte (a) bis (e) in einem einzigen Reaktionsgefäß durchgeführt werden, d.h. daß kein Transfer in ein anderes Reaktionsgefäß erfolgt. Dies hat eine erhebliche Vereinfachung des Verfahrens zur Folge und führt darüber hinaus zu einem verringertem Kontaminationsrisiko.

Noch ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist ein Reagenzienkit, der insbesondere zur Durchführung des vorstehend beschriebenen Verfahrens geeignet ist, umfassend

10 (a) eine Protease,

15

20

- (b) einen Probenaufschlußpuffer,
- (c) einen Waschpuffer,
- (d) einen Elutionspuffer und
- (e) eine Suspension von magnetischen Glaspartikeln.

Noch ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist ein Reagenzienkit zur Isolierung von DNA, umfassend magnetische Glaspartikel deren Glasphase SiO<sub>2</sub>, B<sub>2</sub>O<sub>3</sub> und Na<sub>2</sub>O enthält, und ein Reagenzienkit zur Isolierung von RNA, umfassend magnetische Glaspartikel, deren Glasphase SiO<sub>2</sub>, B<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, AI<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, CaO und Ka<sub>2</sub>O enthält.

Schließlich noch ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist eine Vorrichtung zur Isolierung eines Analyten aus einer biologischen Probe, umfassend:

- einen Probenvorbereiter (1),
  - eine Aufnahmeeinrichtung für Reagenzien (2),
  - eine erste Aufnahmeeinrichtung für Reaktionsgefäße zur Probenvorbereitung (3), die für eine Betriebstemperatur von ≤ 70°C, insbesondere ≤ 40°C eingerichtet ist,
- eine zweite Aufnahmeeinrichtung für Reaktionsgefäße (4a, 4b, 4c), die gegebenenfalls Kühl- oder/und Heizmittel enthält,
  - und ein Robotik-Werkzeugmittel (5).

WO 99/16781 PCT/EP98/06196

- 10 -

Die erfindungsgemäße Vorrichtung ist vorzugsweise so ausgestaltet, daß ein einziges Reaktionsgefäß zur Durchführung der 4 Hauptschritte der Probenvorbereitung, nämlich Aufschluß einer Probe bzw. Lyse, Adsorption des freigesetzten Analyten, z.B. einer Nukleinsäure, an eine feste Adsorptionsmatrix, z.B. magnetische Glaspartikel, Waschen der Adsorptionsmatrix und Elution des Analyten von der Adsorptionsmatrix vorgesehen ist.

5

10

15

20

25

30

Die Vorrichtung ist so ausgestaltet, daß die erste Aufnahmeeinrichtung zur Aufnahme der Reaktionsgefäße für die Probenvorbereitung zumindest für die Adsorption des Analyten an die fest Adsorptionsmatrix und für das Waschen der Adsorptionsmatrix vorgesehen ist. In einer bevorzugten Ausführungsform ist die erste Aufnahmeeinrichtung weiterhin zum Aufschluß der Probe oder/und zur Elution des Analyten von der Adsorptionsmatrix vorgesehen. Die Reaktionsgefäße zur Probenvorbereitung haben ein Volumen von vorzugsweise mindestens 1 ml, z.B. 1-5 ml.

Die zweite Aufnahmeeinrichtung ist für Reaktionsgefäße zur Aufbewahrung oder/und Weiterverarbeitung des Analyten vorgesehen, z.B. PCR-Gefäße, die üblicherweise eine von den zur Probenvorbereitung verwendeten Reaktionsgefäßen verschiedene Form aufweisen. Die Reaktionsgefäße zur Aufbewahrung oder/und Weiterverarbeitung haben ein Volumen von vorzugsweise bis zu  $500 \,\mu$ l, z.B.  $50\text{-}200 \,\mu$ l. Darüber hinaus kann die zweite Aufnahmeeinrichtung Gefäße für Reagenzien enthalten, die zur Weiterverarbeitung der den Analyten enthaltenden Probe benötigt werden, z.B. einen PCR-Mastermix.

Die erfindungsgemäße Vorrichtung kann so ausgestaltet sein, daß einer oder mehrere Schritte der Probenvorbereitung oder/und ein Nachbehandlungsschritt bei einer erhöhten Temperatur in der zweiten Aufnahmeeinrichtung erfolgen können. Hierzu kann die zweite Aufnahmeeinrichtung zur Aufnahme von Reaktionsgefäßen für zumindest einen Behandlungsschritt vorgesehen sein, der ausgewählt ist aus dem Aufschluß der Probe, der

15

20

25

30

Elution der Probe von der Adsorptionsmatrix und einem Nachbehandlungsschritt nach der Elution.

Die erste Aufnahmeeinrichtung umfaßt vorzugsweise Mittel zur magnetischen Separation. Weiterhin ist bevorzugt, daß die erste Aufnahmeeinrichtung Mittel zum Mischen der Reaktionsgefäße, insbesondere durch Drehen um deren Längsachse umfaßt. Solche Mittel können gegebenenfalls auch für die zweite Aufnahmeeinrichtung vorgesehen sein.

Das Robotik-Werkzeug umfasst im allgemeinen automatische Pipettiereinrichtungen sowie gegebenenfalls Mittel zum Transport von Reaktionsgefäßen, z.B. zwischen erster und zweiter Aufnahmeeinrichtung. Außerdem kann eine Deckel-Öffnungs- und Schließeinheit integriert sein.

Im folgenden sind spezielle Ausführungsformen für erfindungsgemäße Vorrichtungen im Detail dargestellt. Bei der in Abbildung 1 gezeigten Ausführungsform enthält der Probenvorbereiter (1) eine Aufnahmeeinrichtung für Reagenzien (2), eine Aufnahmeeinrichtung für Reaktionsgefäße zur Probenvorbereitung (3) mit den Funktionen Mischen und Magnetseparation, die für eine Temperatur von vorzugsweise ≤ 40°C und besonders bevorzugt Raumtemperatur vorgesehen ist. Weiterhin enthält die Vorrichtung eine Aufnahmestation für weitere Reaktionsgefäße (4a), z.B. für PCR-Gefäße, die eine Temperatur von 4°C bis Raumtemperatur aufweist. Weiterhin enthält die Vorrichtung automatisierte Einrichtungen für die Pipettierung und Handhabung von Reaktionsgefäßen (5), die Bewegungen in X, Y und Z Richtung ermöglichen. Bei dieser Ausführungsform der erfindungsgemäßen Vorrichtung finden die vier Hauptschritte der Probenvorbereitung, nämlich Lyse, Adsorption, Waschen und Elution in der ersten Aufnahmeeinrichtung in einem einzigen Reaktionsgefäß statt. Die Lagerung von Eluaten und die Zugabe weiterer Reagenzien, z.B. PCR-Mastermix, erfolgt in der zweiten Aufnahmeeinrichtung. Zur Weiterverarbeitung, z.B. für eine nachfolgende PCR, werden die Gefäße zu einer entsprechenden Vorrichtung, z.B. einem Thermocycler (nicht gezeigt) transferiert.

In der in Abbildung 2 gezeigten Ausführungsform enthält die Vorrichtung eine zweite Aufnahmeeinrichtung (4b), die zur Aufnahme von Weiterverarbeitungsreaktionsgefäßen, z.B PCR-Gefäßen, vorgesehen ist und die Einstellung einer Temperatur von 4°C (Kühlung des PCR-Mastermix) bis 95°C zum Erhitzen des Eluats nach der Elution von der Adsorptionsmatrix vorgesehen ist. Zur Vermeidung der Kondensatbildung am Deckel der PCR-Gefäße ist eine Deckelgegenheizung bevorzugt.

Gemäß der in Abbildung 3 dargestellten Ausführungsform der erfindungsgemäßen Vorrichtung ist eine zweite Aufnahmeeinrichtung für Reaktionsgefäße (4c) vorgesehen, welche zur Aufnahme von PCR-Gefäßen und Probenvorbereitungsgefäßen vorgesehen ist. In dieser zweiten Aufnahmeeinrichtung kann eine Kühlung, z.B. auf 4°C, und ein Aufheizen, z.B. auf 95°C, zum Erhitzen des Lysats oder/und des Eluats erfolgen. Auch hier ist zur Vermeidung der Kondensatbildung am Deckel von Reaktionsgefäßen eine Deckelgegenheizung bevorzugt.

20

25

5

10

15

Gemäß noch einer weiteren Ausführungsform der vorliegenden Erfindung (nicht gezeigt) ist die erste Aufnahmeeinrichtung zur Einstellung einer Temperatur im Bereich von ≤ 70°C vorgesehen. Die zweite Aufnahmeeinrichtung ist - wie in Abbildung 3 gezeigt - für das Kühlen und Heizen von Probenweiterverarbeitungs- und Probenvorbereitungsgefäßen geeignet.

Die erfindungsgemäßen Vorrichtungen sind insbesondere zur Anwendung in einem Verfahren wie zuvor beschrieben einsetzbar.

Weiterhin wird die vorliegende Anmeldung durch die folgenden Figuren und Beispiele näher erläutert. Es zeigen:

- Abbildung 1 die schematische Darstellung einer ersten Ausführungsform der erfindungsgemäßen Vorrichtung,
- Abbildung 2 die schematische Darstellung einer zweiten Ausführungsform der erfindungsgemäßen Vorrichtung,
- Abbildung 3 die schematische Darstellung einer dritten Ausführungsform der erfindungsgemäßen Vorrichtung,
  - Abbildung 4 das Ergebnis eines Chlamydien-Nachweises durch PCR mit manueller und semiautomatisierter Probenvorbereitung,
  - Abbildung 5 das Ergebnis eines Chlamydien-Nachweises durch PCR mit semiautomatisierter Probenvorbereitung und unterschiedlichen Temperaturprofilen bei der Probenvorbereitung,
  - Abbildung 6 das Ergebnis eines HIV-Nachweises durch PCR mit manueller Probenvorbereitung (Standardprotokoll) und semiautomatisierter Probenvorbereitung bei Raumtemperatur.

Beispiele

10

15

#### 1. Herstellung von magnetischen Glaspartikeln

Es wurden zwei verschiedene Sole verwendet. Die Herstellung der Sole erfolgte wie folgt:

Sol 1:  $(SiO_2:B_2O_3:Na_2O=40:8:2)$ 

- Alkokolate der Oxide wurden in obigen Molverhältnissen analog der Vorgehensweise in Beispiel 1 und 2 von WO96/41811 miteinander zu einer homogenen Phase verrührt. In Abweichung dazu wurde kein HCl eingesetzt.
- Anschließend wurden 30 g Iriodin 600 Black Mica (Merk) in 100 ml Sol eingerührt.

15

20

25

30

#### Sol 2: $(SiO_2:B_2O_3:K_2O:Al_2O_3:CaO = 76:15:5:2:2)$

Alkokolate der Oxide wurden in obigen Molverhältnissen analog der Vorgehensweise in Beispiel 1 und 2 von WO96/41811 miteinander zu einer homogenen Phase verrührt. In Abweichung dazu wurde kein HCl eingesetzt.

Anschließend wurden 30 g Iriodin 600 Black Mica (Merk) in 100 ml Sol eingerührt.

Die Sole wurden anschließend einem Sprühtrocknungsvorgang unterzogen.

Das durch die Sprütrocknung erhaltene Pulver wurde einer Feinteilabtrennung durch Sedimentation, einer Temperaturbehandlung unter Stickstoffatmosphäre (60 l/h Volumenstrom) bei einer Aufheizgeschwindigkeit von 1 K/min unterzogen und 1 h einer Verdichtungstemperatur im Bereich von 600 bis 700°C für eine Stunde gehalten. Anschließend wurde der Ofen auf 300°C abgekühlt und bei dieser Temperatur für 1 h mit Sauerstoff gespült. Nach Abkühlung auf Raumtemperatur wurden die magnetischen Glaspartikel entnommen und zur Abtrennung des Grobanteils auf ein 50  $\mu$ m-Sieb aufgegeben und gesiebt.

Die aus Sol 1 erhaltenen magnetischen Glaspartikel sind insbesondere zur Isolierung von DNA geeignet. Die aus Sol 2 erhaltenen Glaspartikel sind insbesondere zur Isolierung von RNA geeignet.

 Standardprotokoll zur Probenvorbereitung für die Isolierung von Nukleinsäuren, z.B. DNA

Zur Isolierung von Nukleinsäuren aus biologischen Proben wie etwa Vollblut oder kultivierten Zellen ist das folgende Standardprotokoll geeignet. Die auf diese Weise erhaltenen Nukleinsäuren können direkt nach der Elution für eine Amplifikation durch PCR, eine Restriktionsspaltung oder einen Southernblot eingesetzt werden.

#### Der Reaktionskit enthält:

5

15

20

- Bindepuffer (4,7 mol/l Guanidiniumhydrochlorid, 10 mmol/l Harnstoff,
   10 mmol/l Tris HCl, 20% Triton® X-100, pH 5,7
- 2. Iyophilisierte Proteinase K (zur Auflösung in H<sub>2</sub>O auf eine Konzentration von 20 mg/ml)
- Waschpuffer (56% (v/v) Ethanol, 20 mmol/NaCl, 10 mmol/l Tris HCl pH 7,5)
  - 4. Elutionspuffer (10 mmol/l Tris pH 8,5)
  - 5. magnetische Glaspartikel (MPG)
    - a) Tabletten mit jeweils 7,5 mg der Glaspartikel oder
    - b) 15%ige Suspension der Glaspartikel in Ethanol

Die Kitkomponenten sind stabil und können bei Raumtemperatur gelagert werden. Nach Auflösung der Proteinase K in Wasser sollte die Lösung aliquotiert und bei -20°C aufbewahrt werden. Die eingefrorene Lösung ist für 12 Monate stabil.

#### Standardprotokoll

- 200 μl Probe werden in ein 2 ml Reaktionsgefäß gegeben und mit
   200 μl Bindepuffer und 40 μl Proteinase K-Lösung versetzt. Anschließend wird für 10 min inkubiert. Die Inkubation erfolgt vorzugsweise bei Raumtemperatur. Unter bestimmten Umständen kann die Inkubationstemperatur jedoch auch auf bis zu 70°C erhöht werden.
- Nach der Inkubation werden 200 μl Isopropanol und eine MGP
   Tablette (oder alternativ 200 μl MGP Suspension) zugegeben und für
   5 min bei Raumtemperatur inkubiert.

PCT/EP98/06196

10

15

- Das Reaktionsgefäß wird in einen Magnetpartikelseparator (Boehringer Mannheim, Kat. No. 1 641 794) gegeben und für etwa 1 min separiert.
- 5 4. Der Überstand wird verworfen und die Reaktionsgefäße werden aus dem MP-Seperator entnommen.
  - Nach Zugabe von 500 μl Waschpuffer wird der Inhalt des Reaktionsgefäßes gemischt und erneut in den MP-Separator für etwa 1 min gegeben.
    - 6. Der Überstand wird verworfen. Schritt 5 wird dreimal widerholt. Nach dem letzten Waschvorgang wird der restliche Waschpuffer vollständig entfernt.
    - 7. Zur Elution werden 100 µl gegebenenfalls auf 70°C vorgewärmter Elutionspuffer zugegeben. Dann wird gemischt und für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Probe wird in den MP-Separator gegeben und der Überstand in ein sauberes Reaktionsgefäß überführt.
    - 8. Die so erhaltenen Nukleinsäuren, z.B. DNA, sind stabil und können anschließend direkt weiterverarbeitet oder bei 4°C aufbewahrt werden.
- Das obige Protokoll kann auch entsprechend bei Mikrotiterplatten, z.B. Tieflochmikrotiterplatten (z.B. Ritter, H.J. Bioanalytic), verwendet werden.

25

#### 3. Chlamydia trachomates DNA-Nachweis durch PCR

#### 3.1 Manuelles Standardprotokoll zur Probenvorbereitung

- 200 μl einer Urinprobe und 240 μl Bindepuffer/Proteinase K-Lösung (5:1) werden in ein 2 ml Reaktionsgefäß pipettiert, einem Vortexmischen unterzogen und bei 70°C für 10 min inkubiert. Dann wird die Probe für 5 min auf Raumtemperatur abgekühlt.
- Zur Probe werden 200 μl isopropanolische MGP-Lösung pipettiert.
  Unmittelbar anschließend erfolgt Vortexmischen. Die Probe wird dann für
  15 min auf einem Mischer, z.B. Thermomischer 5436 (Eppendorf), inkubiert.
- Die MGP werden durch Überführung der Probe in einen Magnetseparator konzentriert. Nach einer Minute wird der Überstand vollständig abpipettiert.

Es werden 0,5 ml Waschpuffer zu den MGPs pipettiert. Die Probe wird einem Vortexmischen unterzogen und dann in den Magnetseparator überführt. Der Überstand wird nach 1 min abpipettiert. Die Waschprozedur wird noch zweimal wiederholt.

Den MGP werden 200 ml Elutionspuffer zugesetzt. Die Probe wird 10 min bei 70°C auf einem Thermomischer bei 1400 RPM inkubiert. Kondenswasser wird durch kurze Zentrifugation gesammelt. Die Probe wird in den Magnetseparator überführt und nach 1 min 180  $\mu$ l Eluat abgenommen. Das Eluat wird in ein neues Reaktionsgefäß pipettiert und bei 4°C (bei einer Aufbewahrungsdauer < 24 h) oder bei - 20°C (bei längerer Aufbewahrungsdauer) aufbewahrt.

Für die PCR werden 50  $\mu$ l Eluat eingesetzt. Die Auswertung erfolgt durch Elektrochemilumineszenz.

10

15

25

30

#### 3.2 Protokoll für ein semiautomatisiertes Verfahren

Statt des in 3.1 beschriebenen Vortexmischens und der Temperierung auf einem Thermoblock wird ein semiautomatisiertes Verfahren durchgeführt, bei dem das Mischen und die Temperierung auf einem Misch- und Temperiermodul erfolgt. Abbildung 4 zeigt einen Vergleich der Bestimmung von Chlamydien (Probe: 100 Elementarantikörper pro 100 ml Urin; Sechsfachbestimmung) zwischen dem manuellen Standardprotokoll (Vortex) und dem semiautomatisierten Verfahren (MTM). Es ist ersichtlich, daß durch die Automatisierung keine Beeinträchtigung der Sensitivität erfolgt.

#### 3.3 Semiautomatisiertes Protokoll bei Raumtemperatur

Die Probenvorbereitung erfolgt wie unter Punkt 3.2 beschrieben. Die Lyse und die Elution werden jedoch bei Raumtemperatur durchgeführt.

# 3.4 Semiautomatisiertes Probenvorbereitungsprotokoll bei Raumtemperatur mit anschließender Nachbehandlung des Eluats

Die Probenvorbereitung erfolgt wie unter Punkt 3.3 beschrieben. Nach der Elution erfolgt eine Inkubation für 10 min bei 70°C.

Abbildung 5 zeigt einen Vergleich der Chlamydienbestimmung (Proben: SWE1, O Chlamydia-Elementarantikörper (EAK) pro ml Urin, SWE 2: 10 EAK, SWE 3:100 EAK und SWE 4:1000 EAK jeweils pro ml Urin) zwischen den in den Punkten 3.2, 3.3 und 3.4 beschriebenen Probenvorbereitungsprotokollen. Es ist ersichtlich, daß für die Bestimmung von Chlamydien das Standardprotokoll gegenüber einer Probenvorbereitung bei Raumtemperatur (RT-Protokoll MTM) sensitiver ist. Die Ergebnisse der Probenvorbereitung bei Raumtemperatur und anschließender Nachbehandlung des Eluats (RT-Protokoll MTM mit Nachbehandlung) zeigen jedoch, daß dieser Effekt

10

20

25

30

größtenteils kompensiert werden kann. Überraschenderweise ist daher während der Probenvorbereitung selbst kein Temperaturschritt erforderlich.

Durch diese Erkenntnis läßt sich das Probenvorbereitungsverfahren entscheidend vereinfachen, denn die Schritte der Lyse, der Adsorption, des Waschens und der Elution können bei Temperaturen ≤ 40°c erfolgen, was eine Automatisierung vereinfacht, da keine Deckelgegenheizung und Temperaturregulierung erforderlich ist.

#### 4. HIV-RNA Nachweis durch PCR

#### 4.1 Manuelles Standardprotokoll zur Probenvorbereitung

Geforenes Plasma wird 5 min bei 37°C aufgetaut und zur weiteren Verarbeitung auf Eis gekühlt.

In ein 1,5 ml Sarstedt-Reaktionsgefäß werden 50  $\mu$ l einer Proteinase K Lösung (25 mg/ml) pipettiert. Dazu werden 250  $\mu$ l Probe gegeben und im Vortex gemischt. Dann werden 300  $\mu$ l Lysepuffer zugegeben und erneut im Vortex gemischt.

Es wird 10 min bei Raumtemperatur auf einem Eppendorfmischer bei 13.000 RPM inkubiert. Dann werden 300  $\mu$ l einer MGP Suspension (6 mg/ml MGP in Isopropanol) zugegeben, im Vortex gemischt und 20 min bei Raumtemperatur bei fortgesetztem Mischen inkubiert. Die MGP werden auf einem Magnetseperator abgetrennt und der Überstand vollständig entfernt.

Zu den MGP werden 750  $\mu$ l Waschpuffer gegeben. Die MGP werden resuspendiert und wie zuvor beschrieben abgetrennt. Die Waschprozedur wird viermal wiederholt, wobei am Ende der Waschpuffer sorgfältig entfernt wird.

WO 99/16781 PCT/EP98/06196

Dann werden  $100\,\mu$ l Elutionspuffer zugegeben und die MGP resuspendiert. Nach 15minütiger Inkubation bei 80°C auf einem Eppendorf Thermomischer (13.000 RPM) werden 90  $\mu$ l Eluat in eine neues Reaktionsgefäß überführt. Für die anschließende HIV-Bestimmung durch RT-PCR werden 40  $\mu$ l Eluat verwendet.

#### 4.2 Semiautomatisiertes Standardprotokoll für die Probenvorbereitung

Die Probenvorbereitung erfolgt wie unter Punkt 4.1 beschrieben, abgesehen davon, daß das Mischen und die Temperierung auf einem Misch- und Temperiermodul erfolgte.

#### 4.3 Semiautomatisiertes Protokoll bei Raumtemperatur

- Die Probenvorbereitung erfolgt im wesentlichen wie unter Punkt 4.2 beschrieben, außer daß alle Schritte bei Raumtemperatur durchgeführt werden. Die Inkubationsdauer für Lyse, Adsorption und Elution beträgt jeweils 15 min.
- Aus Abbildung 6 ist ersichtlich, daß durch die Automatisierung und die Probenvorbereitung bei Raumtemperatur (RT-Protokoll MTM) keine Beeinträchtigung der Sensitivität gegenüber dem Standardprotokoll bei manueller Probenvorbereitung (manuell) erfolgt. Sowohl bei negativen, niedrigpositiven, mittelpositiven und hochpositiven Plasmen werden reproduzierbare Ergebnisse erhalten.

#### Ansprüche

- Verfahren zur Isolierung eines Analyten aus einer biologischen Probe, umfassend die Schritte:
  - (a) Aufschließen der Probe in einem Reaktionsgefäß,
  - (b) Zugeben einer festen Adsorptionsmatrix,
  - (c) Inkubieren unter Bedingungen , bei denen der Analyt an die Adsorptionsmatrix bindet,
  - (d) Entfernen nichtgebundener Probenbestandteile aus dem Reaktionsgefäß,
  - (e) Inkubieren unter Bedingungen, bei denen der Analyt von der Adsorptionsmatrix eluiert wird, und
  - (f) Abtrennen des Eluats von der Adsorptionsmatrix.

15

10

Verfahren nach Anspruch 1,
 dadurch gekennzeichnet,
 daß Schritt (a) die Zugabe einer Protease und eines Denaturierungspuffers umfaßt.

20

- Verfahren nach Anspruch 2,
   dadurch gekennzeichnet,
   daß man Proteinase K als Protease verwendet.
- Verfahren nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet,

daß man einen Denaturierungspuffer, der ein Guanidiniumsalz, insbesondere Guanidiniumhydrochlorid oder/und Guanidiniumthiocyanat enthält, verwendet.

15

20

25

- Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß man magnetische Glaspartikel als feste Adsorptionsmatrix verwendet.
- Verfahren nach Anspruch 5,
   dadurch gekennzeichnet,
   daß die magnetischen Glaspartikel in Form einer Suspension zugegeben werden.
- Verfahren nach Anspruch 5 oder 6,
   dadurch gekennzeichnet,
   daß man Glaspartikel verwendet, deren Glasphase SiO<sub>2</sub>, B<sub>2</sub>O<sub>3</sub> und Na<sub>2</sub>O oder SiO<sub>2</sub>, B<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, CaO und K<sub>2</sub>O enthält.
  - 8. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche,
    dadurch gekennzeichnet,
    daß die Adsorptionsmatrix einer Menge zugegeben wird, die um
    höchstens 50% über der Menge liegt, die zur quantitativen Bindung
    des in der Probe vorliegenden Analyten benötigt wird.
- Verfahren nach einem der vorhergehdnen Ansprüchen, dadurch gekennzeichnet, daß zumindest während der Schritte (c), (d) oder/und (e) ein kontinuierliches oder intervallartiges Mischen ohne Zusatz externer Mittel erfolgt.
- 10. Verfahren nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß das Mischen durch Drehung des Reaktionsgefäßes um seine Längsachse erfolgt.

10

15

20

- Verfahren nach Anspruch 9 oder 10,
   dadurch gekennzeichnet,
   daß die Dauer zur Durchführung der Schritte (c) oder/und (e) jeweils
   maximal 20 min beträgt.
- 12. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß Schritt (d) ein gegebenenfalls mehrmaliges Zugeben und Absaugen eines Waschpuffers umfaßt.
- 13. Verfahren nach Anspruch 12,
   dadurch gekennzeichnet,
   daß man einen Waschpuffer mit einem Gehalt von mindestens 50%
   (v/v) eines mit Wasser mischbaren organischen Lösungsmittels verwendet.
- 14. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß in Schritt (e) zusätzliche Reagenzien wie etwa Enzyme zugesetzt werden.
  - 15. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche,dadurch gekennzeichnet,daß in Schritt (e) zur Elution ein Niedrigsalzpuffer verwendet wird.
  - 16. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 14, dadurch gekennzeichnet, da in Schritt (e) zur Elution ein Nukleinsäureamplifikations-Mastermix zugesetzt wird.

- 17. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß zumindest die Schritte (c) und (d) bei einer im wesentlichen gleichen Temperatur durchgeführt werden.
- 18. Verfahren nach Anspruch 17, dadurch gekennzeichnet, daß auch Schritt (a) oder/und Schritt (e) bei einer im wesentlichen gleichen Temperatur durchgeführt werden.
- 19. Verfahren nach Anspruch 17 oder 18,dadurch gekennzeichnet,daß die Temperatur im Bereich von Raumtemperatur bis 40°C liegt.
- Verfahren nach einem der Ansprüche 17 bis 19,
   dadurch gekennzeichnet,
   daß die Temperatur im Bereich von 18°C bis 32°C liegt.
- Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche,
   dadurch gekennzeichnet,
   daß Schritt (a) oder/und Schritt (e) bei einer erhöhten Temperatur durchgeführt werden.
- Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche,
   dadurch gekennzeichnet,
   daß nach Schritt (f) ein Nachbehandlungsschritt bei erhöhter
   Temperatur erfolgt.
- 23. Verfahren nach Anspruch 21 oder 22,

  dadurch gekennzeichnet

  daß die erhöhte Temperatur im Bereich von mehr als 40°C bis 95°C liegt.

- 24. Verfahren zur Isolierung eines Analyten aus einer biologischen Probe, umfassend die Schritte:
  - (a) Aufschließen der Probe in einem Reaktionsgefäß,
  - (b) Zugeben einer festen Adsorptionsmatrix,
  - (c) Inkubieren unter Bedingungen, bei denen der Analyt an die Adsorptionsmatrix bindet,
  - (d) Abtrennen der nichtgebundenen Probenbestandteile von der Adsorptionsmatrix,
  - (e) Inkubieren unter Bedingungen, bei denen der Analyt von der Adsorptionsmatrix eluiert wird, und
  - (f) Abtrennen des Eluats von der Adsorptionsmatrix, wobei zumindest die Schritte (c) und (d) bei im wesentlichen der gleichen Temperatur durchgeführt werden.
- Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß der Analyt eine Nukleinsäure ist.
- Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche,
   dadurch gekennzeichnet,
   daß die Durchführung des Verfahrens in einer automatisierten
   Vorrichtung erfolgt.
- Verfahren nach Anspruch 1 oder 24,
   dadurch gekennzeichnet,
   daß die Schritte (a) bis (e) in einem einzigen Reaktionsgefäß durchgeführt werden.
- 28. Reagenzienkit, insbesondere zur Durchführung des Verfahrens nach einem der Ansprüche 1 bis 27, umfassend
  - (a) eine Protease,

- (b) einen Probenaufschlußpuffer,
- (c) einen Waschpuffer,
- (d) einen Elutionspuffer und
- (e) eine Suspension von magnetischen Glaspartikeln.
- 29. Reagenzienkit zur Isolierung von DNA, umfassend magnetische Glaspartikel, deren Glasphase SiO<sub>2</sub>, B<sub>2</sub>O<sub>3</sub> und Na<sub>2</sub>O enthält.
- 30. Reagenzienkit zur Isolierung von RNA, umfassend magnetische Glaspartikel, deren Glasphase  $SiO_2$ ,  $B_2O_3$ ,  $AI_2O_3$ , CaO und  $K_2O$  enthält.
  - 31. Vorrichtung zur Isolierung eines Analyten aus einer biologischen Probe, umfassend
    - einen Probenvorbereiter (1),
    - eine Aufnahmeeinrichtung für Reagenzien (2),
    - eine erste Aufnahmeeinrichtung für Reaktionsgefäße zur Probenvorbereitung (3), die für eine Betriebstemperatur von ≤ 70°C, insbesondere ≤ 40°C eingerichtet ist,
      - eine zweite Aufnahmeeinrichtung für Reaktionsgefäße (4a, 4b, 4c), die gegebenenfalls Kühl- oder/und Heizmittel enthält,
    - und ein Robotik-Werkzeugmittel (5).
  - 32. Vorrichtung nach Anspruch 31,
    - dadurch gekennzeichnet,

daß ein einziges Reaktionsgefäß zum Aufschluß einer Probe, zur Adsorption des Analyten an eine feste Adsorptionsmatrix, zum Waschen der Adsorptionsmatrix und zur Elution des Analyten von der Adsorptionsmatrix vorgesehen ist.

5

15

20

- Vorrichtung nach einem der Ansprüche 31 oder 32,
   dadurch gekennzeichnet,
  - daß die erste Aufnahmeeinrichtung zur Aufnahme der Reaktionsgefäße für die Probenvorbereitung zumindest für die Adsorption des Analyten an eine feste Adsorptionsmatrix und für das Waschen der Adsorptionsmatrix vorgesehen ist.
- 34. Vorrichtung nach Anspruch 33, dadurch gekennzeichnet,
  - daß die erste Aufnahmeeinrichtung weiterhin zur Aufnahme der Reaktionsgefäße für die Probenvorbereitung für das Aufschluß der Probe oder/und für die Elution des Analyten von der Adsorptionsmatrix vorgesehen ist.
- 35. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 31 bis 34, dadurch gekennzeichnet, daß die zweite Aufnahmeeinrichtung zur Aufnahme von Reaktionsgefäßen zur Aufbewahrung oder/und Weiterverarbeitung des Analyten vorgesehen ist.

5

10

36. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 35, dadurch gekennzeichnet, daß die zweite Aufnahmeeinrichtung zur Aufnahme von Gefäßen für Reagenzien zur Weiterverarbeitung der Probe vorgesehen ist.

25

30

Vorrichtung nach einem der Ansprüche 31 bis 36,
 dadurch gekennzeichnet,

daß die zweite Aufnahmeinrichtung zur Aufnahme von Reaktionsgefäßen für zumindest einen Behandlungsschritt bei erhöhter Temperatur vorgesehen ist, der ausgewählt ist aus dem Aufschluß der Probe, der Elution der Probe von der Adsorptionsmatrix und einem Nachbehandlungsschritt nach der Elution.

15

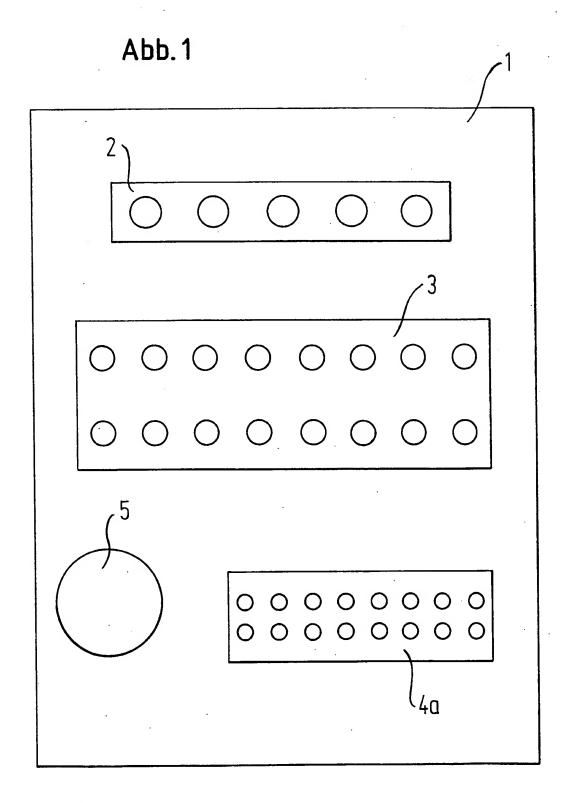
20

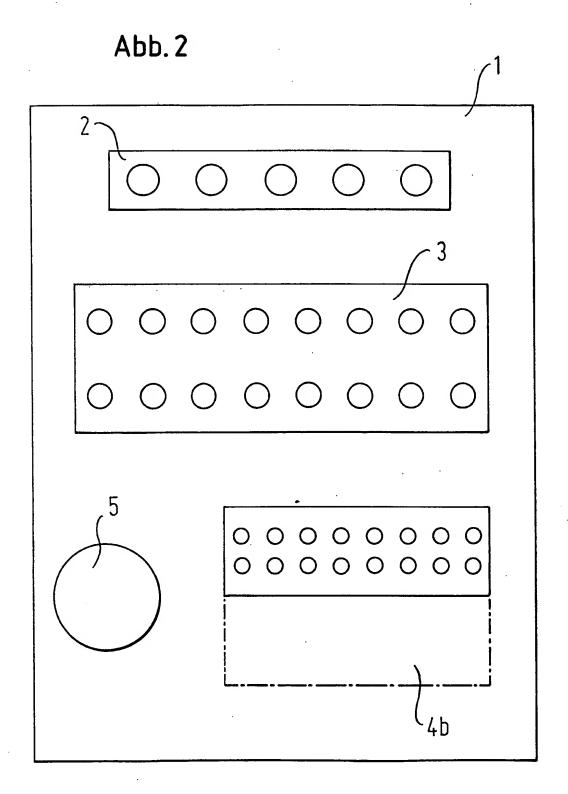
- 38. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 31 bis 37, dadurch gekennzeichnet, daß die erste Aufnahmeeinrichtung Mittel zur magnetischen Separation umfaßt.
- 39. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 31 bis 38, dadurch gekennzeichnet, daß die erste Aufnahmeeinrichtung Mittel zum Mischen der Reaktionsgefäße durch Drehen um deren Längsachse umfaßt.
- 40. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 31 bis 39, dadurch gekennzeichnet, daß das Robotik-Werkzeug automatische Pipettiereinrichtungen und gegebenenfalls Mittel zum Öffnen und Schließen von Reaktionsgefäßen umfaßt.
- 41. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 31 bis 40, dadurch gekennzeichnet, daß das Robotik-Werkzeuk Mittel zum Transport von Reaktionsgefäßen zwischen erster und zweiter Aufnahmeeinrichtung umfaßt.
- 42. Magnetische Glaspartikel umfassend einen magnetischen Kern und eine Glashülle, die SiO<sub>2</sub>, B<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, ein Alkalimetalloxid und gegebenenfalls Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> und ein Erdalkalimetalloxid enthält.
- 43. Glaspartikel nach Anspruch 41,

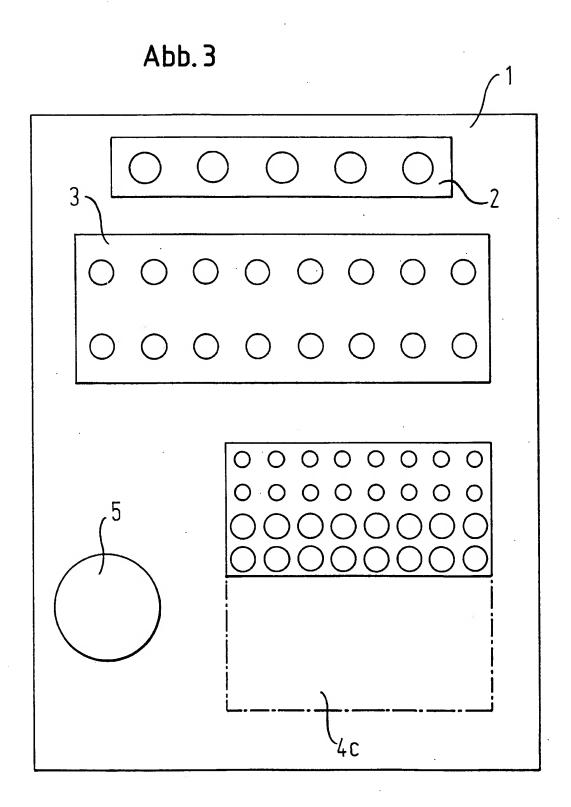
  dadurch gekennzeichnet,

  daß die Glashülle SiO<sub>2</sub>, B<sub>2</sub>O<sub>3</sub> und Na<sub>2</sub>O oder SiO<sub>2</sub>, B<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, K<sub>2</sub>O

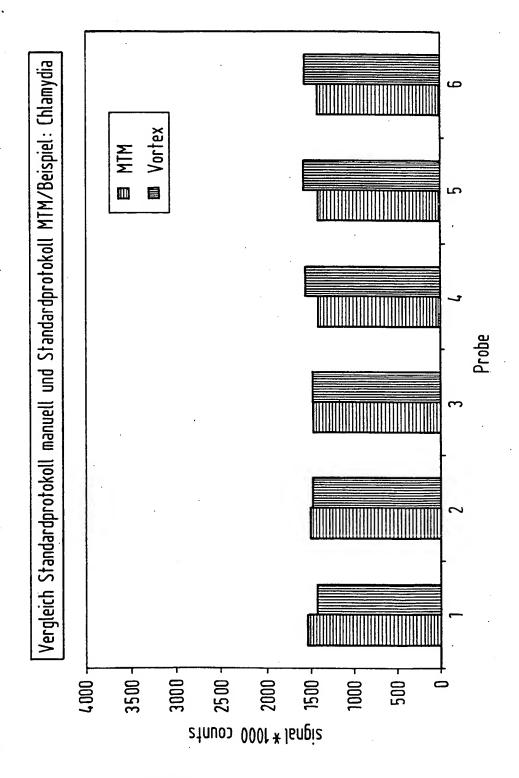
  und CaO enthält.



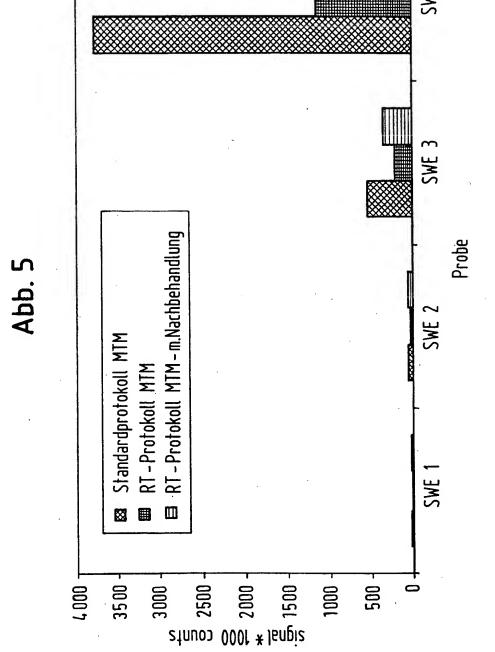




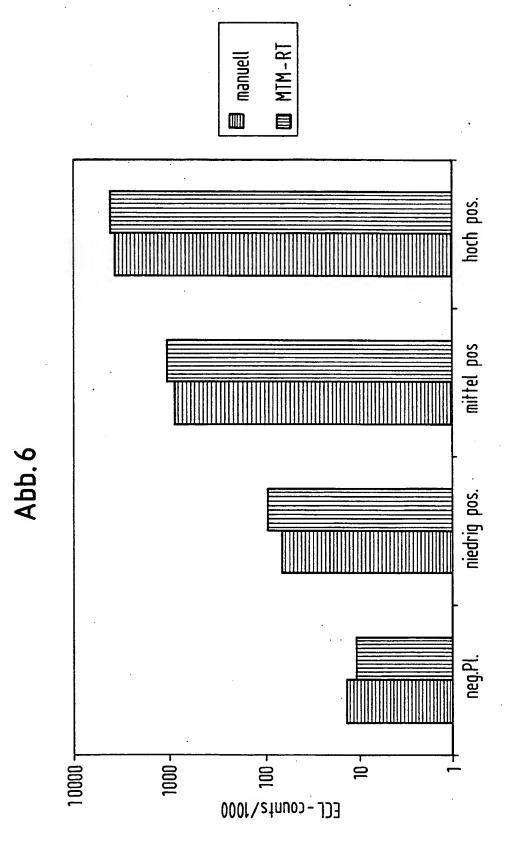




ERSATZBLATT (REGEL 26)



ERSATZBLATT (REGEL 26)



**ERSATZBLATT (REGEL 26)**